

論文内容要旨

ヒト胚性幹（ES）細胞由来神経堤細胞の前後軸決定

統合健康科学部門 口腔生物工学

（主指導教員：二川 浩樹 教授）

統合健康科学部門 生体構造・機能修復学

（副指導教員：里田 隆博 教授）

統合健康科学部門 医療システム・生体材料工学

（副指導教員：村山 長 教授）

三村 純代

論文内容要旨

論文題目 ヒト胚性幹 (ES) 細胞由来神経堤細胞の前後軸決定

学位申請者 三村 純代

【目的】

顎顔面領域の多くの器官は、神経堤に由来する細胞と他の細胞の相互作用により形成される。神経堤は、頭尾軸（前後軸）方向に伸びる組織であり、前後軸方向の位置によって頭部神経堤と体幹部神経堤に分類されるが、これらの位置決定はホメオボックス (HOX) 転写因子群によって制御されると考えられている。しかし、頭部神経堤細胞と体幹部神経堤細胞の特徴の違いや、前後軸位置決定の時期、前後軸位置決定因子について、未解明な点が多く残されている。神経堤は第四の胚とも言われ、様々な組織に分化するが、一過的にびまん性に現れるため、動物胚を用いた研究では解析が困難であった。近年、ヒト胚性幹 (Embryonic stem; ES) 細胞から神経堤細胞への効率的な分化誘導法が報告され、神経堤細胞の分化制御機構についての研究が可能になってきた。

本研究では、頭部神経堤への分化誘導機構の解明を目的として、ヒト ES 細胞から神経堤細胞への分化誘導における HOX 遺伝子発現を検討した。

【方法】

Menendez らの方法 (Menendez et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108:19240-5) に従って神経堤細胞への分化誘導を行った。すなわち、細胞はヒト ES 細胞株 H9 (WA09) を用い、シングルセルに分散して細胞数を計測し、Wang らのヒト ES 細胞用培地 (Wang et al., Blood, 2007, 110:4111-9) から Activin A を除いた組成に SB431542 と Wnt3a を添加した分化誘導培地を用いて、マトリジェルをコーティングしたマルチウェルプラスチックプレートに播種した。培地交換は毎日行い、培養 4, 6, 8, 10 日目に、20 種類の増殖因子を各ウェルに添加し、培養 0, 4, 7, 8, 12, 14, 16 日目に RNA を抽出した。HOX 遺伝子の発現は HOX 遺伝子 PCR アレイを用いて検出し、遺伝子発現プロファイル解析はヒートマップおよびスキャッタープロットにて示した。さらに、神経堤のマーカー遺伝子や前方および後方遺伝子の発現プロファイルを詳細に検討するために、定量的 RT-PCR 法、蛍光免疫染色法、およびフローサイトメトリー (FACS) 法を用いて解析した。

【結果】

Menendez らの方法を用いて 15 日間培養した細胞が神経堤細胞であることを確認するため、免疫染色を行った。神経堤マーカーである HNK-1 は、培養 0 日目の細胞では認められなかったが、培養 15 日目の細胞において約 80% の細胞で発現しており、神経堤細胞であることを確認した。また、これらの神経堤細胞の前後軸に沿った位置価に対する分子マーカーの発現を蛍光免疫染色法により検討したところ、前方マーカーである DLX1 およ

び後方マーカーである *HOXB9* の発現は、*HNK-1* と同様に培養 0 日目の細胞では認められなかったが、培養 15 日目において、約 70% の細胞が *DLX1* および *HOXB9* 共陽性細胞であった。次に、PCR アレイを用いて培養 0, 7, 14 日目の細胞における *HOX* 遺伝子群の発現プロファイルを解析した。クラスター解析を行ったところ、培養 7, 14 日目の細胞における遺伝子発現プロファイルは、培養 0 日目の細胞とは異なるクラスターに分類された。また、培養 7, 14 日目では、未分化マーカーである *POU5F1* (*OCT3/4*) および *OTX2*、中内胚葉マーカーである *MIXL1* の発現は減少し、神経堤マーカーである *PAX3* の発現が増加した。一方で、後方マーカーである *HOXB9*、*CDX2* の発現や前方マーカーである *MSX1* の発現も増加した。以上の結果から、上記方法にて神経堤は誘導されているものの、前方および後方の両方の遺伝子が発現しており、位置情報が決定されていないと考えられた。

Wnt シグナルは脊椎動物の胚発生において後方化を促進すると知られている。神経堤分化誘導因子として添加している *Wnt3a* が濃度依存的に前後軸の位置情報を制御していることが推察された。そこで、神経堤分化誘導時に添加する増殖因子が前方マーカーおよび後方マーカーの遺伝子発現に与える影響について検討した。まず、神経堤分化誘導時に種々の濃度で *Wnt3a* を添加し、定量的 RT-PCR 法にて神経堤および神経マーカー、前方・後方マーカーの発現レベルを測定した。*p75* などの神経堤マーカーの発現は、*Wnt3a* 処理時間依存的に増加したが、*Wnt3a* の濃度による有意な差は認められなかった。神経マーカーである *PAX6* の発現は、*Wnt3a* の濃度依存的に有意に減少した。一方、前方マーカーである *HOXA2*、後方マーカーである *HOXB9*、*CDX2* の発現は、*Wnt3a* の濃度依存的に増加した。これらの結果から *Wnt3a* により神経への分化が抑制されるとともに神経堤細胞へ分化し、前方、後方の遺伝子は誘導されるが、位置情報は制御されていないことが示唆された。

次に、ヒト ES 細胞から神経堤へ誘導中の *Wnt3a* 存在下において、種々の増殖因子 20 種を単独で培地へ添加し、前方・後方マーカーの発現レベルに影響を及ぼす因子を探索した。その結果、前方および後方マーカーの発現に影響を与える因子 4 種を同定した。そのうち 3 種はそれぞれ神経堤誘導培地に添加すると、*p75* の発現の減少や *PAX6* の発現の増加が認められ、神経堤細胞への分化を抑制した。一方で、残りの 1 種は *p75* の発現を高いレベルで維持し、前方マーカーである *DLX1* の発現を増加させた。この結果から、同因子は *Wnt3a* 存在下で前方神経堤を誘導することが明らかとなった。

【結論】

本研究の結果より、Menendez らによるヒト ES 細胞からの神経堤細胞分化誘導においては、前後軸の位置情報が制御されていないことが明らかとなった。この条件に前後軸を制御する特定の因子を神経堤分化誘導培地に添加することにより、前方化を促進し、頭部神経堤細胞を特異的に誘導できる可能性が示唆された。